

別紙 1

## 論文審査の要旨

報告番号	甲 第 3233 号	氏 名	稲田 大佳暢
論文審査担当者	主査 教授 飯島 毅彦		
	副査 教授 井上 富雄		
	副査 教授 中村 雅典		
(論文審査の要旨)			
(1) 論文要旨			
<p>【背景・目的】下歯槽神経(IAN)の損傷による感覚鈍麻の治療は軸索の早期再生を必要とする. Schwann 細胞のオートファジーは, 神経損傷後に生じる神経再生阻害因子であるミエリンタンパクを除去し, 軸索再生に重要な要因である. 本研究では, オートファジーのアロステリック阻害薬として用いられる rapamycin の感覚鈍麻に対する治療効果を検証する.</p> <p>【方法】ラットの IAN を切除した IANX 群と, 切除を行わない sham 群を作製した. IAN 切除後, 切除部に rapamycin または dimethyl sulfoxide を連日投与し, 下唇へ逆行性神経トレーサー (FG) を投与した. IAN 切除部と三叉神経節 (TG) 第 3 枝領域における各種タンパクの発現量と FG 陽性細胞数をウエスタンブロット法と免疫組織化学的染色法を用いて解析した. IANX 群と sham 群の下唇に機械的刺激を与えた際の逃避反射閾値 (HWT) を経日的に測定した.</p> <p>【結果】rapamycin 投与により, IAN 切除部のオートファジー抑制マーカーとミエリンタンパクの発現量は低下し, オートファジー活性マーカーの発現量は上昇した. IAN 切除部においてオートファジー活性マーカーである Beclin 1 は Schwann 細胞のマーカーである GFAP と共発現していた. rapamycin 投与により, TG 第 3 枝領域における BDNF 陽性細胞数と FG 陽性細胞数は上昇した. IANX 後に HWT の上昇を認めたが, rapamycin 投与により有意に回復した.</p> <p>【考察】IAN 切除後の rapamycin 投与は, Schwann 細胞のオートファジー活性化を介して効率的に神経再生阻害因子を除去し, 軸索再生を促進し, 感覚鈍麻の治療効果をもたらすことが示唆された.</p>			
(2) 主査・副査からの質問と回答			
副査:井上 富雄 教授からの質問と回答			
1. オートファジーの抑制系が阻害されることでオートファジーが活性化されたのか。それともオートファジーを直接活性化するメカニズムも働いたか。			
mTOR は 2 種類の複合体を形成する。その内の一つである mTORC1 はオートファジーを促進する ULK1 を阻害することでオートファジーを抑制している。本研究で用いた Rapamycin は生体内			

(主査が記載)

で FKBP12-Rapamycin 複合体を形成し mTORC1 の活性を阻害する。その結果、ULK1 が活性化されてオートファジーが促進する。つまり、本研究は Rapamycin の投与によってオートファジー抑制系を阻害することによって、オートファジーが活性化したと考えられる。

## 2. LC3-II と GFAP との共発現は調べたか。

下歯槽神経切除部位での LC3-II の免疫組織化学染色を行ったが、染色性が悪かったため GFAP との共発現を調べることは出来なかった。代替案としてウェスタンブロットによる定量解析を行った。

### 副査：中村 雅典 教授からの質問と回答

#### 1. IAN の Schwann 細胞でのオートファジー活性は他の末梢神経と同じか。

本研究と同様に坐骨神経損傷後に Rapamycin を投与してオートファジー活性を調べた論文は複数ある。LC3 をはじめとしたオートファジー活性マーカーはいずれの論文でも発現量が増加しており、本研究と同様の結果を得られていることから、IAN の Schwann 細胞でのオートファジー活性は他の末梢神経と同じように起こっていると考えられる。

#### 2. Rapamycin を選択した根拠は何か。

過去の論文において Rapamycin が坐骨神経などの末梢神経損傷後の軸索再生に寄与する報告がなされていた。また、Rapamycin は臓器移植における免疫抑制剤やリンパ脈管筋腫症の治療薬としてヒトに対して臨床応用がなされている薬剤であるため、末梢神経損傷による感覚障害の治療薬として今後の臨床応用への展望が立てやすいことが本研究で Rapamycin を選択した理由として挙げられる。

### 主査：飯島 毅彦 教授からの質問と回答

#### 1. ラパマイシンや 3-MA の投与結果から神経再生が起こったことを証明出来るのか。

下歯槽神経切除群に対してラパマイシン、DMSO あるいは 3MA 投与後した際に、神経切除後に上昇した逃避反射閾値がラパマイシン投与群では DMSO 投与群と 3MA 群と比較して有意に低下していたことから、感覚機能が回復していることが分かる。また、下歯槽神経切除群にラパマイシンを投与した後の逃避反射閾値の低下について、ラパマイシン投与により痛覚過敏を誘発したとも考えられるが、Sham 群においてはラパマイシン投与後に逃避反射閾値の低下を認めないことから、その可能性は否定的である。むしろ、過去の研究においてラパマイシンの投与によって痛覚過敏が改善したとの報告も認める。

また、三叉神経節第 3 枝支配領域においてラパマイシンの投与によって FG 標識 TG 細胞数が増加していたことから、切除部位が組織学的に回復していることが推測される。

以上のことから、ラパマイシンの投与により神経再生が促進されたことが証明される。